Aus der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Freien Universität Berlin
im Städt. Rudolf-Virchow-Krankenhaus
Direktor: Professor Dr. med. Hans Wolfgang Spier

Verbesserung des Pilznachweises durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungsmethoden

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Ulrich Rusch
aus Plathe (Pomm.)

1965

Aus der Klinik und Poliklinik für Haut- und
Geschlechtskrankheiten
der Freien Universität Berlin
im Städt. Rudolf-Virchow-Krankenhaus
Direktor Professor Dr. med. Hans Wolfgang Spier

VERBESSERUNG DES PILZNACHWEISES DURCH FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Ulrich Rusch
aus Plathe (Pomm.)

Dekan:	Professor Dr. med. Wilhelm Masshoff
Referent:	Professor Dr. med. Rudolf Kaden
Korreferent:	Professor Dr.med.dent. Hermann Kirsten

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 23.11.1965

Inhaltsverzeichnis

I. Problemstellung

II. Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie und allgemeine Ergebnisse

III. Eigene Untersuchungen

A. Methodischer Teil

1.) Das Fluoreszenzmikroskop

2.) Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Brauchbarkeit für den fluoreszenzmikroskopischen Pilznachweis

3.) Die Mikrophotographie des fluoreszenzmikroskopischen Bildes

B. Untersuchungsgut und Ergebnisse

1.) Vergleichende Ergebnisse

a) Bildvergleich zwischen Nativ- und fluorochromierten Präparaten im Fluoreszenzmikroskop

b) Vergleichende Untersuchungen an Hautmaterial von 320 Patienten

c) Farbvergleich zwischen Hefen und Dermatophyten

d) Vergleichende Untersuchungen mit der Tesafilmabrißmethode

2.) Weitere Untersuchungen

a) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Pilzkulturen

b) Vitalfluorochromierung von Candida albicans

IV. Diskussion

V. Zusammenfassung

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546516_0076

I. Problemstellung

Für die Diagnose einer Dermato- oder Onymykose sowie für die Feststellung mykologischer Sanierung bei Abheilung nach Griseofulvinbehandlung ist zumindest der mikroskopische Pilznachweis unerläßlich. Es kommen immer wieder Fälle vor, bei denen im suspektivem Untersuchungsmaterial mit Hilfe der üblichen Kalilaugenpräparierung keine Pilzelemente nachweisbar sind, obwohl sich in späteren Wiederholungsuntersuchungen Pilze finden lassen. Wenn auch meist die Ursache in der Abnahme unzulänglichen oder ungeeigneten Materials zu suchen ist, so dürfte sie bisweilen auch an den Schwierigkeiten der mikroskopischen Untersuchungstechnik liegen. Da die Praxis aber eine einwandfreie mikroskopische Sicherung der klinischen Diagnose fordert, erscheint es angebracht, mit einer anderen Untersuchungsmethode nach Verbesserungen zu trachten.

Die mykologische Diagnostik ist besonders auf gute mikroskopische Darstellung der Pilzorganismen angewiesen. Trotz des hohen Entwicklungsstandes unserer Mikroskope besteht die Forderung nach besserer Darstellungsmöglichkeit der zarten und farbkontrastarmen Pilzmorphen. Es ist daher begreiflich, daß alle neueren mikroskopischen Untersuchungsverfahren in die mykologische Forschung mit einbezogen werden.

Im einzelnen war folgende Aufgabe gestellt:

1.) Beschreibung des fluoreszenzmikroskopischen Bildes und Pilzfärbung mit basischen, sauren sowie elektroneutralen Fluorochromen.

2.) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Hautpräparaten nach der Tesafilmabrißmethode.

3.) Vergleichende Untersuchungen nach Nativpräparierung und Fluorochromierung sind in einem bestimmten Zeitraum anzustellen.

4.) Prüfung, ob Hefen, insbesondere Candida albicans, sich ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch darstellen lassen und ob sie sich mit dieser Methodik besser abgrenzen lassen als im Routineverfahren.

Auf Grund der Ergebnisse sollte die Frage beantwortet werden, ob die Fluoreszenzmikroskopie eine entscheidende Verbesserung im Nachweis von Pilzen bringt und ob diese Untersuchungsmethode gegenüber der Nativpräparierung Vorteile hat.

II. Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie und allgemeine Ergebnisse

Bei der Sondereinrichtung der Fluoreszenz-Mikroskopie macht man Gebrauch von der Erscheinung der Fluoreszenz. Diese ist ein Spezialfall der Lumineszenz, unter welchem Namen man diejenigen Leuchterscheinungen an festen, flüssigen oder gasförmigen Körpern versteht, die nicht durch Zufuhr von Wärmeenergie ausgelöst werden. Von Fluoreszenz spricht man dann, wenn Lichtausstrahlung bei Absorption eingestrahlten Lichts auftritt. Es gilt dabei mit wenigen Ausnahmen die Stockesche Regel: Die Fluoreszenz-Strahlung ist langwelliger als die erregende Strahlung (K. M I C H E L (1)).

Daß man die Fluoreszenz zu mikroskopischen Zwecken verwenden kann, hat zum ersten Mal A. KÖHLER im Jahre 1910 erkannt. Ausgesprochene Spezialeinrichtungen zur Fluoreszenzmikroskopie haben C. R E I - C H E R T (2) und L E H M A N N (3) beschrieben. Um eine systematische Bearbeitung des Gebietes hat sich vorzugsweise H A I T I N G E R (4) bemüht.

DAVIDSON und GREGORY zeigten, daß sich der Fluoreszenzstoff mit heißem Wasser aus Haaren extrahieren läßt, stickstoff- und phenolhaltig ist und Aldehydgruppen enthält.

Besitzt ein Objekt in natürlichem Zustand Fluoreszenzerscheinungen, so spricht man von primärer Fluoreszenz. Es ist möglich, Körper, die in natürlichem Zustand nicht fluoreszieren, durch Ein- oder Ablagerung bestimmter Stoffe zur Fluoreszenz zu bringen. Man spricht dann von sekundärer Fluoreszenz und bezeichnet die angewandten Stoffe als Fluorochrome.

Die sekundären Fluoreszenzfarben, die geeignete Objekte nach Behandlung mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen bei Betrachtung im Blaulicht (4800 - 3000 Å) oder ultraviolettem Licht (3000 Å) aufweisen, sind so leuchtend und kontrastreich, daß es der Fluorochromierung nicht schwerfiel, sich neben der Diachromierung, der Färbung mit Hellfarbstoffen (Diachromen) durchzusetzen.

Ziel der Fluorochromierung ist der Nachweis einzelner histochemisch definierbarer Strukturelemente, wie z.B. Eiweißkristall, Öle und Fette. Außerdem kann man morphologisch wichtige Teile hervorheben.-

Die Veröffentlichung von S. v. P R O W A Z E K (5) im Jahre 1914 nahm das Problem der sekundären Fluoreszenzmikroskopie bereits zu einem Zeitpunkt vorweg, in dem fast alle Voraussetzungen für ihre praktische Verwirklichung fehlten. PROWAZEK war mit den damaligen Hilfsmitteln noch nicht in der Lage, dieses weitschauende Programm auszuschöpfen. Es standen ihm lediglich Fluoreszein, Eosin, Neutralrot und Chinin als Fluorochrome zur Verfügung.

Erst 19 Jahre später, wenn man von den mit Auflicht beobachteten Fluorochromierungen am lebenden Objekt absieht, wurde dieses Aufgabengebiet mit wesentlich verbesserten Apparaten durch H A I T I N G E R (6) für den histologischen Sektor systematisch erschlossen. Seitdem ist auch das Auffinden von Sporen, Bakterien, sogar von Viren, zum Gegenstand einer gezielten Fluorochromierung geworden. Die Auswertung der sehr schönen histologischen Fluorochromierungen, besonders im histochemischen Sinne, ist immer schon mit Schwierigkeiten verbunden gewesen. In den anglo-amerikanischen Ländern spielt die Fluoreszenzmikroskopie mit Fluorochromen bei weitem nicht die Rolle wie

in Deutschland, Frankreich und Oesterreich; lediglich über Beobachtungen von Primärfluoreszenz wird hin und wieder berichtet.

Die Fluorochrome lassen sich am einfachsten vom physikalisch-chemischen Standpunkt her einteilen. Man unterscheidet:

1. Kathodische Fluorochrome, die in wässriger Lösung stark dissoziiert sind. Träger der Fluoreszenzerscheinungen sind die Kationen.
2. Anodische Fluorochrome, fluoreszierender Anteil sind die Anionen.
3. Elektroneutrale Fluorochrome, die im gesamten pH-Bereich praktisch nicht dissoziiert sind.

Nach S T R U G G E R (7) lösen sich die erst bei bestimmten pH auftretenden elektroneutralen Moleküle rein physikalisch in Lipoiden. Sie sind stark selektiv lipoidlöslich. Auch Adsorptionserscheinungen - z.B. an Cellulose - sind nicht grundsätzlich anders als bei Diachromen.

Die Tatsache, daß ein und derselbe fluoreszierende Farbstoff bei Adsorption an verschiedenen Bestandteilen des Substrats, - an Polysacchariden, Fetten oder Proteinen - verschiedene Fluoreszenzfarben liefert, erklärt W E S S E L (8) folgendermaßen:

Der durch die kurzwellige Primärstrahlung zur Fluoreszenz angeregte Körper sendet, durch quantenhafte Umwandlung der Strahlung, Fluoreszenzlicht von verschiedener Wellenlänge zurück zum Beobachter. Das Fluoreszenzlicht ist stets langwelliger und deshalb von geringerer Härte als die auslösende Primärstrahlung. Zwischen den verschieden stark absorbierenden Substratbestandteilen entstehen auch unterschiedliche Energiedifferenzen zwischen Grund- und Anregungszustand. Dies bedeutet nichts anderes als verschiedene Wellenlängen des emittierenden Lichtes

und damit verschiedene Farben. Meistens aber sind die Fluorochrome des Handels Mischungen verschiedener fluoreszierender Einzelbestandteile, so daß Farbdifferenzen kaum auszuschließen sind (H A R M S (9)).

Auf das Phänomen der Konzentrationslöschung der Fluoreszenz und auf die ebenfalls praktisch wichtige Fluoreszenzlöschung durch fremde Einflüsse weist F Ö R S T E R (10) hin. Es kann die Konzentrationslöschung positiv oder negativ sein. Im ersteren Falle sinkt die Fluoreszenzintensität von einer gewissen Konzentration ab, im zweiten Falle tritt Fluoreszenz erst in konzentrierteren Lösungen auf. Bei Akridinorange verschiebt sich das Fluoreszenzspektrum mit steigender Konzentration, so daß die Fluoreszenzfarbe von grün in rot umschlägt. Diese Eigenschaft steht isoliert da.

Über die Fluoreszenzlöschung durch die Häm-Komponente in Häminproteiden, Hämoglobin, in Erytocyten, Katalase etc., hat G. W E R T H (11) berichtet, der mit den Fluorochromen Fluorescein, Euchresin, Thioflavin und Berberinsulfat arbeitete.

Die Fluoreszenzlöschung durch Schwermetalle verlangt Beachtung bei der Fixierung. Insbesondere Sublimat muß unbedingt vermieden werden, weil es die Fluoreszenz völlig unterdrückt, Chromate sind dagegen als Bestandteile von Fixierungsflüssigkeiten zulässig (H A I T I N G E R (4)).

Durch die Arbeiten von S. S T R U G G E R (7) wurde Akridinorange zu dem am meisten verwendeten Fluoreszenzfarbstoff. Seine Feststellung, daß lebende Zellen, mit Akridinorange 1 : 10 000 gefärbt, grün, abgestorbene aber kupferrot fluoreszieren ("Konzentrations-Metachromasie"), gab Anlaß zu einer erheblichen Anzahl von teils zustimmenden,

teils ablehnenden Arbeiten.

Nach N. SCHÜMMELFELDER (12) verhielten sich verschiedene Gewebsarten von Wirbeltieren gegenüber der Akridinorange-Färbung verschieden, ohne daß Unterschiede zwischen lebenden und toten Geweben erkennbar waren. Karzinomzellen speichern Akridinorange in extrem hohem Ausmaß, so daß orangerote Fluoreszenzfarben auftreten.

Weiterhin haben nach SCHÜMMELFELDER verschiedenartige Zellen erhebliche Differenzen in der Farbstoffaufnahme und -Speicherung. Die unterschiedliche Speicherungsfähigkeit soll der verschiedenen Stoffwechselaktivität der Zellen entsprechen. Es bestehen bestimmte Beziehungen zwischen Glycolyse der Zellen und der Speicherung von Akridinorange. Auch die Intensität und Dauer der Ultravioletten-Bestrahlung begünstigt den Speicherungsvorgang, sie führt zur Freilegung von Nucleotiden aus ihrer Bindung an Proteinen.

K. ZEIGER und H. HARDERS (13) berichten über vitale Fluorochromfärbung des Nervengewebes. Auf dem Höhepunkt der Farbaufnahme wird Akridinorange bevorzugt an ribonucleotidhaltigen Orten im Cytoplasma, und zwar reversibel, gespeichert.

Überhaupt wird neben der von STRUGGER betonten Bindung der Farbstoffkationen an das Eiweißmicellargerüst in steigendem Maße auch die Rolle der Nucleinsäuren berücksichtigt, so von W. GÖSSNER (14), K. ZEIGER, H. HARDERS und W. MÜLLER (15) u.a. GÖSSNERs Befunde lassen auch einen wesentlichen Anteil der Nucleinsäuren bzw. Nucleotide erkennen.

Werden fixierte Drüsenzellen des Pankreas, die infolge besonders hohen Ribonucleotidgehalts rot fluoreszieren, mit Ribonuclease behandelt, so fluoreszieren sie nach dieser Behandlung nur noch grün. Bei sehr geringem Gehalt an oder bei Fehlen von Nucleotiden findet auch an toten Zellen nur sehr geringe Farbstoffaufnahme statt und damit Grünfluoreszenz.

Die große Wichtigkeit der Nucleinsäuren für die Fluorochromierung mit Akridinorange bestätigte auch die Arbeit von K. Z E I G E R und M. W I E - D E (16)).

Eine besonders eingehende Untersuchung für die Fluorochromierung tierischen Protoplamas mit Akridinorange stammt von N. S C H Ü M M E L F E L - D E R (17)). Ein Einfluß zelleigener Fermente auf die Speicherung, die im allgemeinen so verläuft, wie sie STRUGGER an Pflanzenzellen beobachtet hat, konnte nicht erwiesen werden. Nach ihm spielt außer der Elektroadsorption auch eine solche durch van der WAAL'sche Kräfte eine Rolle.

Die Ansicht, daß die rote Fluoreszenz toter Zellkerne (wenigstens in gewissen Fällen) ein Phänomen der elektroadsorptiven Speicherung ist, vertraten K. H Ö F L E R, A. T O T H und M. L U H A N (18)).

H Ö F L E R (19) erklärt die rote Fluoreszenz "leerer", d.h. an Speicherungsstoffen armer Zellsäfte - in den Vakuolen - durch eine "Ionenfallen"-Wirkung und will daher auch den Begriff der Konzentrationsmetachromasie nicht beseitigen. Unter "Ionenfallen"-Wirkung versteht er das Permeiren von Farbbasen-Molekülen aus der neutralen oder alkalischen Farblösung in den leicht sauren Zellsaft, dort werden sie ionisiert und reichern sich an, weil

das Plasma in Übereinstimmung mit der Lipoidtheorie nur für solche Moleküle, nicht aber für Ionen permeabel ist, eine Wiederauswanderung also nicht möglich ist.

Eine andere Auffassung zu diesem Thema vertrat Dora B O E R N E R - P A T Z E L T (20)). Die nicht auswaschbare grüne Fluoreszenz der lebenden Kerne und der fixierten Kerne nach Fluorochromierung bei einem unter ihrem Isoelektrischen Punkt liegenden pH-Wert sei der Ausdruck einer besonders festen Bindung von Farbstoffen aus ihrer Lösung mit sehr geringer Konzentration an das Substrat und stehe im Zusammenhang mit dem Grundpostulat der HÜTTIG'schen Lehre von den aktiven Zuständen, wonach Anfärbung aus stark verdünnten und damit stark dissoziierten Lösungen mit größerer Bindungsstärke erfolge als aus konzentrierten Lösungen. Bei stärkerer Konzentration in der Farbflotte und - möchte man ergänzen - in rot fluorochromierten Substraten überwiegen die Kräfte der Bindung der Moleküle untereinander (Polymerisation), und die Bindung an das Substrat tritt zurück. Die Rotfluorochromierung ist daher durch Salzlösungen auswaschbar. Die HÖFER'sche Erklärung ist insofern nicht voll befriedigend, als elektrostatische Adsorption und Salzbildung nicht im entscheidenden Gegensatz zueinander stehen. Wenn eine elektronegative Gruppe (COO^-, SO_3^{--} usw.) ein Farbstoffkation angezogen hat, erfolgt ja auch unter Elektroneutralisierung Salzbildung, d.h. Neubildung eines chemischen Stoffes mit Ionenbeziehung.

Die besondere Eignung des Akridinorange für die Fluorochromierung verschiedenster Objekte rührt daher, daß seine Lösungen im physiologisch wichtigen pH-Bereich in breiter Zone permeierfähige Basen-

oder Salzmoleküle und adsorbierbare Kationen nebeneinander enthalten und daß es infolge seiner günstigen Molekül-Gestaltung die besondere Fähigkeit besitzt, sich außerordentlich rasch auf dem Wege der Elektroadsorption in submikroskopische Gefüge der Eiweißkörper des lebenden Protoplasmas einzulagern (S T R U G G E R (21)). Genau belegte Angaben zu diesem Thema brachte V. Z A N - K E R (22)).

Er hat festgestellt, daß das Akridinorange-Molekül im gesamten pH-Bereich in vier verschiedenen Formen vorliegen kann: im alkalischen Bereich existiert die relativ starke, gelbgefärbte Farbbase, in neutraler Richtung belädt sich zuerst der Ringstickstoff, so daß ein positiv einwertiges Kation von Orange-Farbe entsteht. Das neutrale Molekül fluoresziert blaugrün. Bei weiterer Aciditätssteigerung wird ein zweites H-Ion an eine der auxochromen Gruppen angelagert, wodurch ein zweifach positives rotes Kation gebildet wird.

Lebensmittel wurden von K R O G (23) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Fluoreszenzfarben von Fett, Protein und Stärke bei Verwendung verschiedener Fluorochrome wurden von ihm tabellarisch erfaßt.

Durch vergleichende Untersuchungen mit einem Kalilaugen-Parkertinte-Gemisch und dem Kalilaugenverfahren versuchte E N D E R L I N (24) im Jahre 1958, eine Verbesserung des mikroskopischen Pilznachweises zu erreichen.

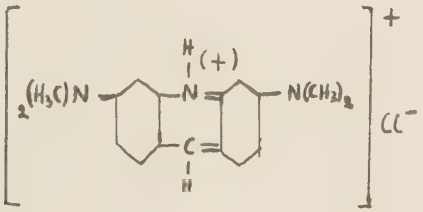
Mit der Verwendung von Tesafilmklebestreifen entwickelten P O R T O (25) und P O L E M A N N (26) eine neue Materialabnahmetechnik zum Nachweis von Dermatophyten.

Über Pilzfilamente vortäuschende sog. Mosaikfungi, ihre Natur und ihr Auftreten, schreibt G Ö T Z (27)).

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen in der Mykologie

In der Mykologie haben das Fluoreszenzphänomen zuerst MARGORAT und DEVEZE 1925 beobachtet.

Der weitaus meistgebrauchte Fluoreszenzfarbstoff ist das Akridinorange. Seine Strukturformel wird wie folgt angegeben:



Tetramethyldiamino-akridiniumchlorid 3,6 - Bis - dimethylamino-akridinium-chlorid. Es ist ein basicher Farbstoff, ein kathodisches Fluorochrom, in Wasser und Alkohol löslich und liegt als Zinkchlorid-Doppelsalz vor.

Auf die praktische Nutzanwendung von fluoreszierenden Farbstoffen für die Mykologie wies H I R T (28) im Jahre 1939 hin, der unter anderem erstmalig Pilzfäden von Malassezia furfur durch Anfärbung am Körper zur Darstellung brachte.

J A N K E (29) konnte dann im Jahre 1951 mittels Akridinorange sowohl Mycelfäden als auch Sporen von Fadenpilzen und Hefen in Hautschuppen als leuchtend grüngelbe Organismen nachweisen. Veranlassung, den Pilznachweis fluoreszenzmikroskopisch

zu versuchen, gaben die zahlreichen in der Methodik des Kalilaugen-Präparates gegebenen Verwechslungen mit pilzähnlichen Bildungen, Woll-, Baumwollfasern, Lanugohaaren, Kalilaugenkristallen, Luftbläschen und Öltropfen und besonders die sog. Mosaikfungi, die heute als Cholesterinstrukturen gedeutet werden.

Für die Untersuchungen wurde die Blaulicht-Fluoreszenzeinrichtung am Pamphot (Leitz) verwandt.
Das Akridinorange erwies sich von zahlreichen anderen Fluorochromen für die Versuche am geeignetsten.

Da die Fluoreszenzeigenschaften eines Fluorochroms abhängig sind von der Farbstoffkonzentration und vom pH-Wert der Untersuchungslösung, besteht eine Beziehung zwischen der isoelektrischen Zone der Eiweißkörper verschiedenster Mikroorganismen und der Anfärbbarkeit mit dem kathodischen Akridinorange, welches im dissoziierten Zustand oberhalb des I.E.P. im schwach sauren Bereich maximal fluorochromiert. Oberhalb pH 9 liegt keine Dissoziation mehr vor, es tritt keine Kationenabsorption mehr ein, sondern es fluorochromiert die lipophile Farbbase, die Baulipoide des Protoplasten. Dieser letztere Effekt erwies sich als geeignet zum Pilznachweis in Hautschuppen und Nagelsubstanz.

Die praktische Durchführung der Fluorochromierung geschah folgendermaßen: Schuppenmaterial wird mit 2 Tropfen 15 % Kalilauge vorsichtig erhitzt. Ein Tropfen Aqua dest. und ein Tropfen Farblösung Akridinorange 1 : 1000 hinzugegeben. Das Präparat kann sofort fluoreszenzmikroskopisch untersucht und beurteilt werden.

Da die hell aufleuchtenden Pilzfäden schon in der Übersichtsvergrößerung gut zu erkennen sind, wird die Durchsicht der Präparate zeitlich wesentlich verkürzt.
Die für das Nativpräparat bekannten Verwechslungs-

Ein weiterer Vorteil liegt in der zeitmäßig kurzen Herstellungsdauer des Präparates, das sofort beurteilt werden kann.

Später bestätigte F L E G E L (30) dessen Resultate und veröffentlichte einen modifizierten Arbeitsgang. Weiterhin gab er eine Methode zur Dauerpräparierung von Pilzmycelien mit Akridinorange an.

C H I C K und B E H A R (31) stellten eine Lösung her, die aus 9 ml 20 % KOH und 1 ml 1 : 1000 wässriger Akridinorangelösung bestand; demnach war die Endkonzentration der Akridinorangelösung 1 : 10 000. Es wurde mit zwei Blaufiltern vor der Lichtquelle und zwei Blau- oder Gelbfiltern am Mikroskop gearbeitet. Es wird betont, das Verwechslungsmöglichkeiten zwischen Pilzmycelien und anderen im abgeblendeten Hellfeld pilzähnlich erscheinenden Substanzen hier kaum zu befürchten sind. Es ist weiterhin vorteilhaft, schnell von der Hellfeldbetrachtung zurückschalten zu können.

III. Eigene Untersuchungen

A. Methodischer Teil

Bei der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen an Patienten der Hautklinik der Freien Universität Berlin im Städt, Rudolf-Virchow-Krankenhaus durchgeführt. In der Mehrzahl der Fälle handelte es sich um Patienten der beiden für Frauen und Männer getrennt eingerichteten Polikliniken. Falls bei der klinischen Diagnose der Verdacht auf eine Pilzinfektion auftauchte, wurden die Patienten zum Pilznachweis im mykologischen Labor untersucht. Bei einigen Fällen handelte es sich um Kontrolluntersuchungen nach durchgeführten antimykotischen Behandlungen.

Von Patienten mit infizierter Haut wurde das Material mit dem scharfen Löffel entnommen. Pilzbefallene Nägel wurden mit einer Glasscherbe abgeschabt. Das so gewonnene Material wurde in Petrischalen gemischt und geteilt. Die eine Hälfte wurde nach konventioneller Art als Kalilaugepräparat im Pilzlaboratorium, die andere Hälfte mit der zur Diskussion stehenden fluoreszenzmikroskopischen Methode untersucht.

1. Das Fluoreszenzmikroskop

Zur mikroskopischen Beobachtung stand uns die große Fluoreszenzeinrichtung der Firma Carl Zeiß, Oberkochen/Württ., zur Verfügung, bestehend aus Standardmikroskop GFL mit der Quecksilber-Höchstdrucklampe Osram HBO 200 L und je einem Satz Erreger- und Sperrfilter (Abb.1).

Abb. 1: Fluoreszenzmikroskopische Einrichtung

Die optische Ausrüstung setzte sich aus den Planachromaten 100/1,32 Oel, 40/0,65 und 10/0,22 zusammen. Die unten beschriebenen Fluoreszenzlichteffekte wurden durch die Erregerfilter BG 12/1 sowie BG 12/II, welche für blauviolette Strahlen durchlässig sind, und die Sperrfilter im Sperrfilterrevolver BG 23 und OG 5 erreicht.

2. Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Brauchbarkeit für den fluoreszenzmikroskopischen Pilznachweis

a) Basische Farbstoffe:
Akridinorange 1 : 10 000 und 20 % KOH zeigte sehr gute Fluoreszenzerscheinungen an Pilzfäden und Sporen, der Hintergrund und die Zellränder fluoreszieren gelblichgrün.

Coriphosphin (Chroma Gesellschaft Schmidt & Co., Stuttgart), in einer Konzentration von 1 : 10 000 mit 20 % Kalilauge angewendet, ergab intensive Fluoreszenz von Mycelien und Sporen. An Leuchtkraft standen die goldgelb fluoreszierenden Pilzfäden denen mit Akridinorange wenig nach. Das umgebende Gewebe wies eine gelbliche Fluoreszenz auf (Abb.7).

Berberinsulfat (Chroma Gesellschaft Schmidt & Co., Stuttgart, 1 : 10 000 mit 20 % Kalilauge, zeigte schwach gelbe bzw. braungelbe Fluoreszenz der Hyphen. Mit diesem Farbstoff war erst 3^h nach der Anfärbung eine befriedigende wenig intensive Fluoreszenz der Pilzfäden zu erreichen. Strukturelle Einzelheiten konnten nur schlecht ausgemacht werden (Abb.6).

b) Saure Farbstoffe:
Thiazolgelb G, 1 : 10 000 mit 20 % Kalilauge, ergab eine rötliche, sehr schwache Fluoreszenz der Hautschuppen, an Mycelien und Sporen wurde weder Farbstoffaufnahme noch Fluoreszenz im Verlauf von 4^h nach der Anfärbung beobachtet.

Auch die Fluorochromierung mit Thioflavin S (Bayer, Leverkusen) zeigte keine Fluoreszenz der Mycelien, das umgebende Gewebe erschien hellgrün.

c) Neutraler Farbstoff:
Mit Rhodamin B, 1 : 10 000 und 20 % Kalilauge, gefärbte Präparate zeigten 3^h nach der Anfärbung nur geringe Farbstoffaufnahme und wenig intensive Fluoreszenzerscheinungen. Die umgebenden Zellen fluoreszierten schwach rötlich (Abb.8).

Tabelle 1 Farbung mit verschiedenen Fluorochromen zur Darstellung der Pilzelemente

---

1.) Sehr gute Farbstoffaufnahme, Pilzelemente schon bei oberflächlicher Betrachtung leicht erkennbar:

Akridinorange
Coriphosphin.

2.) Ausreichende Farbstoffaufnahme, Pilzelemente nur bei sorgfältiger Suche nachweisbar:

Berberinsulfat.

3,) Ungenügende Farbstoffaufnahme, Pilzelemente kaum färbbar, selbst bei eingehender gezielter Einzelsuche schlecht nachweisbar:

Rhodamin B.

4.) Keine Farbstoffaufnahme, Pilzelemente konnten überhaupt nicht nachgewiesen werden, auch nicht bei gezielter Einzelsuche:

Thiazolgelb
Thioflavin S.

Sämtliche Präparate wurden maximal 3min durchmustert. Es wurden mit jedem Farbstoff mindestens zehn Präparate gefärbt und untersucht.

Wegen seiner guten Eignung zur Pilzfluorochromierung wurde hauptsächlich Akridinorange (E. Merck, Darmstadt) benutzt.

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die angegebene Methode der Fluorochromierung von CHICK und BEHAR sich für die vergleichenden Reihenuntersuchungen besonders gut eignet.

Für die Untersuchung des Hautmaterials stellten wir eine 0,1 % Farblösung her und erreichten die Farbstoffentkonzentration 1 : 10 000, indem wir zu 0,1 ml der 0,1 % Farblösung 0,9 ml 20 % Kalilauge hinzufügten.

Für die Vitalfluorochromierung an Pilzkulturen wurde Akridinorange in einer Konzentration von 1 : 1000 hergestellt und der Farbstoff in isotonischer Kochsalzlösung gelöst.

Zur Herstellung der fluorochromierten Präparate wurde eine kleine Menge des entnommenen Materials auf einen gut entfetteten und gereinigten Objektträger gebracht, zwei Tropfen des Fluorochromproduktes hinzugegeben und vorsichtig mit einem Deckglas (24 x 32 mm) abgedeckt.-

Die günstigste Einwirkungszeit des Fluorochromproduktes auf Hautpräparate von der Anfärbung bis zur ersten mikroskopischen Betrachtung betrug ca. 2 Stunden. In Präparaten, die vor Ablauf dieser Zeit mikroskopiert wurden, zeigten die Pilzfilamente oft eine unvollständige Farbstoffaufnahme, während eine längere Einwirkung des Farbstoffes das farbliche Bild nicht wesentlich veränderte. Ließ man die fluorochromierten Präparate 24 Stunden in der feuchten Kammer liegen, zeigte sich unter dem Fluoreszenzmikroskop nur ein verschwommenes Bild.

Präparate von Pilzkulturen konnten sofort nach Anfärbung mikroskopisch untersucht werden, da die Pilzfilamente bereits dann ihre volle Leuchtintensität erreicht hatten.

Das Material für die Hellfeldmikroskopie wurde mit 15 % Kalilauge versetzt, dann zur Aufhellung der Gewebestrukturen 24^{h} in der feuchten Kammer belassen.

Die feuchte Kammer besteht aus einer etwa 20 x 30 cm langen und etwa 6 cm hohen Schale, deren Boden mit Zellstoff ausgelegt wird. Der Zellstoff wird mit einer 0,1 %igen Nipagin-M-Lösung, die 20 % Glycerin enthält, übergossen. Damit die Präparate nicht benetzt werden, liegen sie erhöht auf einem Rost aus Glasstäben. Die Schale wird mit einer passenden Scheibe bedeckt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Besonders für Feilspäne krankheitsverdächtiger Nägel ist ein langes Aufbewahren des Materials in der feuchten Kammer notwendig. Das Keratin wird so genügend optisch durchgängig, und das Präparat erscheint transparenter.

3. Die Mikrophotographie des fluoreszenzmikroskopischen Bildes

Die Mikrophotographie erfolgte mit dem Grundkörper II (Zeiß-Winkel) und dem Gehäuse handelsüblicher Kleinbildkameras (Contax IIa).

Das Filmmaterial bestand aus Agfacolor-Isopan 17° DIN. Die Bestimmung der Belichtungszeit erfolgte durch Probeaufnahmen. Hierbei ergab sich, daß eine Belichtungszeit von 3, 4 und 5 Minuten, je nach Dicke des Materials, ausreichend war.

B. Untersuchungsgut und Ergebnisse

1.) Vergleichende Ergebnisse

a) Bildvergleich zwischen Nativ- und fluorochromierten Präparaten im Fluoreszenzmikroskop.

Das ungefärbte, unter dem abgeblendeten Hellfeld betrachtete Nativpräparat erscheint einfarbig hell, wobei Helligkeitsunterschiede dasselbe differenzieren lassen. Die Mycelien erscheinen als dunkle, manchmal verzweigte fadenförmige Gebilde. In schwierigen Ausnahmefällen fällt es auch einem geübten Untersucher schwer, eine eindeutige Diagnose auf Grund eines Nativpräparates zu stellen, zumal der umgebende unruhig wirkende Zellverband die zarten und kontrastarmen Pilzfäden nur mit Mühe erkennen läßt. (Abb.2).

Die oft im abgenommenen Material befindlichen Lanugohaare, Woll- und Baumwollfasern können leicht mit Pilzelementen verwechselt werden.

Das fluorochromierte Präparat zeigt nach Einschaltung des Blaulichtes und Vorschieben der entsprechenden Erreger- und Sperrfilter deutliche Septierungen der Hyphen, die Mycelien werden hell aufleuchtend in den Vordergrund gestellt, die sie umgebenden Zellen treten weniger sichtbar zurück. (Abb.3).

Man sieht den blauvioletten oder grünlichen Untergrund, die Pilzfäden fallen auf Grund ihrer Form und vor allem wegen ihrer leuchtend gelben oder gelbgrünen Fluoreszenz deutlich ins Auge. (Abb.4).

Beim Spiel mit der Mikrometerschraube treten immer neue Pilzfilamente aus dem dunklen Untergrund hervor, so kann man Dermatophyten,

deren Mycelendpunkte weit über die mikroskopische Feldbegrenzung hinausgehen, bis zum Endseptum verfolgen. (Abb.5).

Bisweilen erkennt man im Verlauf eines Pilzfadens chlamydoartige Aufblähungen. (Abb.5).

Die Breiten der Hyphen variieren zwischen 1,5 und 4,5 µ, teilweise konnte der Zerfall einzelner Pilzfäden in kurze rechteckige Arthosporen beobachtet werden. Oft sieht man große rundliche Sporen 4 - 6 µ, die neben noch nicht gegliederten Mycelfäden reihenartig angeordnet liegen.

Bei sehr dünnen Hautschuppen kann sofort nach der Herstellung des Präparates eine vollständige Durchfärbung der Pilzfilamente erreicht werden.

Von dicken Hautlamellen oder kleinen Hornpartikelchen gewinnt man durch leichten Druck auf das Präparat ein besser durchblickbares Quetschpräparat. Auf diese Präparate muß der Farbstoff längere Zeit - bis zu 2 Stunden - einwirken, da sonst nur eine teilweise Anfärbung der Pilzfäden zustande kommt.-

In der Übersichtsvergrößerung ist eine wenig intensive Fluoreszenz der umgebenden Zellen zu erkennen. Bei stärkerer Vergrößerung tritt sie mehr in den Hintergrund, so daß man das Pilzfilament im Zweifelsfall unter Zuhilfenahme der Vergrößerung und durch die Segmentierung leicht identifizieren kann.

Da bei Textilfasern und Haaren die Fluoreszenz mehr auf die Randschichten beschränkt ist und Septierungen fehlen, sind diese sofort von Pilzelementen zu unterscheiden.

b) Vergleichende Ergebnisse an Hautmaterial von 320 Patienten.

Die Versuche wurden in einem Zeitrum von sechs Monaten angestellt. Nach Nativpräparierung und Untersuchung im abgeblendeten Hellfeld konnten 176 Nativpräparate als positiv erkannt werden, 125 wurden als pilznegativ diagnostiziert. Am Fluoreszenzmikroskop wurden 185 fluorochromierte Präparate als positiv und 116 als negativ befunden.

Häufigkeit des positiven Pilznachweises, getrennt nach den zwei Methoden:

Tabelle 2

Anz. der Präparate	Nativpräparate pos.	neg.	Fluoresz.mikr.M. pos.	neg.
301	176	125	185	116

Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht über 19 Pilzpräparate, die entweder als Malassezia furfur oder als Nocardia minutissima nach althergebrachter Methode diagnostiziert und fluoreszenzmikroskopisch nicht oder nur schlecht erkannt wurden:

Tabelle 3

Anz. der Präparate	Im Fluoreszenzmikroskop nicht oder nur schlecht erkannte Präp.	Malassezia furfur	Nocardia minut.
19	19	12	7

Die Versuche, Nocardia minutissima fluoreszenzmikroskopisch darzustellen, waren unbefriedigend. Das Material dieser Pilzerkrankung wurde nach Fixierung mit Carnoy'scher Lösung und Anfärbung mit Methylenblau diagnostiziert, eine Anfärbung mit

einem Fluorochrom erbrachte kein brauchbares Resultat.

Auch Malassezia furfur konnte besser im Nativpräparat als unter dem Fluoreszenzmikroskop erkannt werden. Die kurzen, plumpen Hyphen waren wegen der ebenfalls fluoreszierenden Zellränder nur schlecht auszumachen.

c) Farbvergleich zwischen Hefen und Dermatophyten.

Hierbei interessierte das Haut- bzw. Nagelmaterial, in dem im Hellfeld mikroskopisch Hyphen nachgewiesen wurden, deren kultureller Nachweis dann aber Hefen zeigte.

Das im Überschuß abgenommene Material wurde bis zur Klärung der kulturellen Diagnose - vier bis sechs Wochen - in sterilen Petrischalen aufbewahrt. Dann wurde das Material, dessen kulturelle Diagnose Candida Art oder Candida albicans oder Trichophyton rubrum oder Trichophyton mentagrophytes ergeben hat, fluoreszenzmikroskopisch auf Farbdifferenzen verglichen. Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Versuchsgruppe:

Tabelle 4 Farbvergleich zwischen Hefen und pathogenen Pilzen

Hellfeld-Mikr.pos.	Kultur Cand.Art	Kultur Cand.alb.	Kultur neg.	Kultur Trich.rubr.	Kultur Tr.ment.
50	9	5	8	14	14

Farbunterschiede zwischen Hefen und Dermatophyten in Patientenpräparaten wurden nicht beobachtet. Als Fluorochromprodukt wurde für diese Versuchsgruppe Akridinorange mit 20 % Kalilauge benutzt.

d) Vergleichende Untersuchungen mit der Tesafilmabrißmethode.

In neuerer Zeit wird zur Materialgewinnung, besonders von den oberflächlichen Hautschichten, Tesafilmklebestreifen benutzt. Man verfährt dabei folgendermaßen:

Ein 2 cm langer Tesafilmklebestreifen wird auf die erkrankte Haut gebracht, 1 1/2 - 2 Minuten dort belassen und danach entfernt. Die oberste Hornschicht bleibt bei dieser Art der Materialabnahme am Streifen haften.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden die Streifen auf Objektträger gebracht und mit einem Tropfen der Farblösung (Akridinorange 1 : 10 000 mit 20 % Kalilauge) unterschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt.

Zur Nativpräparierung dagegen wurden die auf Objektträger gebrachten Streifen nur mit 15 % Kalilauge behandelt und abgedeckt.

Da bei dieser Abnahmemethode nur Material der obersten Hornschichten, in denen sich die Pilzelemente zwar in ursprünglicher Lagerung jedoch in geringer Anzahl befinden, gewonnen wird, zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungsmethode gegenüber der Nativpräparierung.

Von 12 Patienten wurden je zwei Materialproben mit dem Tesafilmklebestreifen entnommen, der eine wurde fluoreszenzmikroskopisch und der andere nach Nativpräparierung untersucht.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung identifizierte deutlich 8 der 12 Fälle als positiv, während die Nativpräparierung nur 5 Fälle als positiv erkannte, 4 Fälle waren bei beiden Untersuchungsmethoden negativ.

Tabelle 5 Vergleichende Untersuchungsergebnisse bei Anwendung der Tesafilmabrißmethode

Präparate je 12	positiv	negativ
Fluoreszenzmikroskopie	8	4
Nativpräparierung	5	7

2.) Weitere Untersuchungen

a) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Pilzkulturen.

Die Hefenkolonien von Candida Art und Candida albicans wurden auf Maismehlagar in Stichkultur, die Dermatophytenkolonien - Trichophyton rubrum und Trichophyton menthagrophytes - wurden auf Sabouraudagar gezüchtet.

Von der Stichkultur wurde das Deckglas auf einen Objektträger übertragen, vom Sabouraudagar wurde mit einer ausgeglühten Platinöse Material auf den Objektträger gebracht, mit der Farblösung - Akridinorange 1 : 10 000 und 20 % Kalilauge - unterschichtet und nach wenigen Sekunden fluoreszenzmikroskopisch beobachtet.

aa) Candida Art: Die Hyphen und Sporen zeigen wenige Sekunden nach der Anfärbung eine blaßgrüngelbe Fluoreszenz. Der Farbstoff verteilt sich stets gleichmäßig, ohne daß stärkere Farbstoffkonzentrationen in Hyphen und Sporen zu finden sind. Morphologisch sieht man gewundene, septierte und unseptierte Hyphen, die häufig Gabelungen aufweisen. Sie sind zum Teil

in bruchstückartige Gebilde von 2 - 5 µ Länge - Arthosporen - zerfallen.(Abb.10, 11).

bb) Candida albicans: Die Hyphen und Sporen zeigen die gleichen Farbeffekte wie unter Candida Art angegeben. Das Agarmycel besteht aus gerade oder geschlängelt wachsenden, wenig verzweigten Hyphen, die von traubenförmigen Hefezellen unterbrochen sind. Man nennt diese Gebilde nach CONANT Pseudomycelien oder Pseudohyphen. Diese Sproßketten fluoreszieren gelblich-grün. Das fluoreszenzmikroskopische Bild zeigt außerdem kreisförmige Chlamydosporen, die vor allem am Ende der Hyphen, vereinzelt aber auch seitlich, auftreten. (Abb.12, 13).

cc) Trichophyten rubrum: Hyphen und Sporen fluoreszieren gelblich. Das Mycel besteht aus deutlich septierten Hyphen mit wenigen Verzweigungen. Die Hyphen haben einen Durchmesser von 2 - 2,5 µ . Morphologische Einzelheiten konnten nicht ausgemacht werden.

dd) Trichophyton menthagrophytes: Hyphen und Sporen fluoreszieren gleichfalls gelblich. Es finden sich sehr viele dünne Hyphen, die ährenförmig mit zahlreichen Mikrokonidien besetzt sind. Manche Bezirke der Hyphen erscheinen optisch leer. Andere Hyphenteile zeigen weniger intensive, andere stärkere Gelbfluoreszenz.

Es wurden je 20 Präparate nach der angegebenen Methode hergestellt und auf Farbunterschiede untersucht.

b) Vitalfluorochromierung von Candida albicans.

Für diese Versuchsreihe wurde Candida albicans auf Maismehlagar gezüchtet, nach Übertragung des Deckglases auf einen Objektträger 1min lang mit der Farblösung - Akridinorange 1 : 1000 gelöst in physiologischer Kochsalzlösung - unterschichtet und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

Anfangs fluoreszierten Sporen und Mycelien nur schwach, mit zunehmender Farbstoffaufnahme und unter Einwirkung des Blaulichtes über einen längeren Zeitabschnitt wurde die Fluoreszenz intensiver. Nach ca. 15min Beobachtungszeit änderte sich das farbliche Bild nur noch wenig. Der größte Teil der Hefezellen fluoresziert nun gelb, einzelne Zellen zeigen Grünfluoreszenz. Fast jede Spore zeigt in der Mitte einen rotorangefluoreszierenden Punkt. (Abb.14).

Eindrucksvolle Farbphänomene kann man an den Pseudemycelien beobachten. Zwischen zwei Septierungen der Pseudohyphen sieht man begrenzte Rotorangefluoreszenz, die wiederum von dunkelgrüner Fluoreszenz unterbrochen wird. Manchmal fallen im Mycel optisch leere, runde Bezirke auf. Die Enden der Septierungen zeigen immer Rotorangefluoreszenz. Eine Entfärbung von Mycelien oder Sporen wurde im Verlauf von 6 Stunden nicht beobachtet. (Abb.15).

Es wurden 12 Präparate nach der angegebenen Methode hergestellt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

IV. Diskussion

1.) Die Fluorochromierung mit basischen-, sauren und elektroneutralen Fluorochromen brachte sehr unterschiedliche Ergebnisse. Die Farbstoffaufnahme der basischen Fluorochrome Akridinorange und Coriphosphin in Mycelien und Sporen setzt bei dünnen Hautschuppen augenblicklich nach der Färbung ein, dies ist am sofortigen Auftreten von fluorochromierten Sporen zu erkennen. Bei dickerem Material - Hornpartikel - ist nach der Fluorochromierung eine Wartezeit von ca. 2^h notwendig, die noch durch leichten Druck auf das Präparat abgekürzt wird. Es wurde immer beobachtet, daß die Farbstoffaufnahme der Mycelien bei Präparaten, die mit Farbstoff und Kalilauge behandelt wurden, sehr viel schneller vonstatten ging als bei Mycelien, die nur mit der Farblösung versetzt wurden. Die Kalilauge scheint eine schnellere Permeation von Akridinorange oder Coriphosphin durch die Zellhülle zu bewirken. Die mit diesen Fluorochromen dargestellten Pilzfäden zeigten eine sehr intensive Leuchtkraft. (Abb.5 und 7).
Im stark alkalischen Bereich wurde immer nur eine gelbliche oder grüngelbe Fluoreszenz beobachtet.- Die im Fluoreszenzbild imponierenden Mycelien und Sporen stellen Orte hoher Farbstoffanreicherung dar. Die Leuchtkraft und Farbe variierten mit dem pH-Wert und der angewendeten Fluorochrom-Menge. Die oft beobachteten Wandaufbauchungen innerhalb der Mycelien erklären wir

uns mit einer weiteren Farbstoffaufnahme vom Außenmedium her. Wir führen die starke Farbstoffanreicherung in den Mycelien, die besonders gut mit den basischen Fluorochromen Akridinorange und Coriphosphin zu erreichen war, auf eine hohe physikalisch-chemische Konzentration zwischen Mycel und dem Lösungsmittel zurück.

Die verzögerte Farbstoffaufnahme mit neutralem Farbstoff und keine Farbstoffaufnahme und Fluoreszenz des Mycels bei Färbung mit sauren Farbstoffen scheint die Konzeption zu bestätigen.

2.) Das fluoreszenzmikroskopische Bild ermöglicht ein sehr viel leichteres und schnelleres Erkennen der Pilzfäden in der Übersichtsvergrößerung. Auch morphologische Einzelheiten sind mit Ölimmersion gut auszumachen. Es werden optische Täuschungen ausgeschlossen, die durch Mosaikfungi und andere pilzähnliche Strukturelemente hervorgerufen werden. Hiermit stehen wir in Einklang mit den Arbeiten von J A N K E, F L E G E L und C H I C K.

3.) Die vergleichenden Untersuchungen erstreckten sich auf 301 Hauptpräparate. In 9 Präparaten konnten mit dem Fluoreszenzmikroskop Pilze nachgewiesen werden, die mit Nativpräparierung nicht erkannt worden waren. Bei 3000 Pilzuntersuchungen im Jahr würde demnach in ca. 90 Fällen der Pilznachweis mit der Nativpräparierung nicht gelingen. 19 Hautpräparate wurden nicht zu vergleichenden Untersuchungen herangezogen, da es sich in

diesen Fällen um Malassezia furfur und Nocardia minutissima handelte, die fluoreszenzmikroskopisch nur schlecht zu diagnostizieren waren.
Im Farbvergleich zwischen Hefen und Dermatophyten wurden keine Farbunterschiede beobachtet.

4.) Vergleichende Untersuchungen an Hautpräparaten, die nach der Tesafilmabrißmethode gewonnen wurden, erbrachten mit Akridinorangefluorochromierung gute Resultate.

5.) Alle auf Maismehlagar gezüchteten Hefen zeigten im stark alkalischen Medium immer eine blaßgrüngelbe Fluoreszenz. An mit Akridinorange und Kalilauge behandelten Mycelien waren außer den morphologischen Unterschieden nur geringe Farbdifferenzen auszumachen. (Abb.11, 13).
Bei der Vitalfluorochromierung von Candida albicans mit Akridinorange 1 : 1000 sah man im Mycel abwechselnd Gelborange- und Grünfluoreszenz.
Nach K R O G (23) fluoreszieren mit Akridinorange Proteine gelborange und Stärke grün. Vermutlich zeigt sich hier die Verteilung von Proteinen und Stärke im Mycel.

6.) Eine völlige Umstellung von der Nativpräparierung zur Fluoreszenzmikroskopie ist wegen der noch ziemlich teuren und kurzlebigen Quecksilberhöchstdrucklampen sehr kostspielig. Angebracht wäre es, das Material in Petrischalen abzunehmen, und unter besonderen Umständen

oder bei negativen und zweifelhaften Präparaten sollte man zumindest vom Materialüberschuß eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Kontrolle vornehmen. Auch bei Schnelldiagnosen ist die Fluorochromierung dem Nativpräparat überlegen. Eine schnelle Umschaltung von der Fluoreszenz- zur Hellfeldbetrachtung ist mit dem Fluoreszenzmikroskop möglich. (Abb. 2, 3).

Das etwas kleinere Gesichtsfeld in der Übersichtsvergrößerung kann kaum als Nachteil bezeichnet werden. (Abb. 6).

Bei Nageltoiletten ist die Beurteilung des Präparates wegen auftretender Fluoreszenzlöschung durch die Hämoglobin-Komponente schwierig.

V. Zusammenfassung

1.) An Sporen und Pilzhyphen zeigten die Färbungen mit den elektropositiven Fluorochromen Akridinorange und Coriphosphin eindrucksvolle Fluoreszenzerscheinungen. Mit elektronegativen Fluorochromen - Thiazolgelb G und Thioflavin S - wurde keine Fluoreszenz beobachtet. Rhodamin B fluoreszierte erst nach einer Einwirkungszeit von 3 - 4^{h}. Die Leuchtkraft war mangelhaft.

2.) Mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte beim Pilznachweis eine Mehrausbeute von fast 3 % im Vergleich zu Untersuchungen mit Nativpräparaten an Hand von 301 Patienten erzielt werden.

3.) Tesafilmabrißpräparate erwiesen sich für fluoreszenzmikroskopische Darstellungen als brauchbar.

4.) Mit Akridinorange 1 : 1000 konnten in Sporen und Mycelien von Candida albicans Farbunterschiede beobachtet werden, die vermutlich der Verteilung von Protein und Stärke entsprechen.

5.) Auf Grund des wiedergegebenen Bildmaterials und unseren Erfahrungen kommen wir zu der Ansicht, daß der routinemäßigen Anwendung des fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungsverfahrens nur die Kostspieligkeit der Apparatur im Wege steht. Die Fluoreszenzmikroskopie bietet für spezielle mykologische Untersuchungsaufgaben durch die Eigenart in der Darstellung gewisse Vorteile.

III. Literatur:

1. MICHEL, K.: "Die wissenschaftliche und angewandte Photographie" 10, 606 (1957) Springer-Verlag, Wien

2. REICHERT, K.: "Das Fluoreszenzmikroskop" Phys.Z. 12, 1010 (1911)

3. LEHMANN, H.: "Das Lumineszenzmikroskop" Z.wiss.Mikrosk.30, 417(1913)

4. HAITINGER, M.: "Fluoreszenzmikroskopie" Akad. Verlags G.m.b.H., Leipzig (1938)

5. PROWAZEK, S.v.: Kleinwelt 6, 39 (1914)

6. HAITINGER, M.: "Die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie" Abderhalden, Handb.d.biol. Arbeitsmethoden Abt.II, Teil 3, S.3322 (1934) Verlag Urban u.Schwarzenberg, Berlin-Wien

7. STRUGGER, S.: "Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie" Schaper-Verlag Hannover (1949)

8. WESSEL, P.: "Physik" Teil II, 292 (1950) S. Hirzel Verlag, Leipzig

9. HARMS, H.: "Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie" Teil II. 72. (1957) Staufen-Verlag, Kamp-Lintfort

10. FÖRSTER, Th.: "Fluoreszenz organischer Verbindungen" Göttingen Verlag Vandenhock und Ruprecht (1951)

11. WERTH, G.: "Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an menschlichem Knochenmark" Acta Haematol. 10, 209 (1953)

12. SCHÜMMELFELDER, N.: "Über Beziehungen zwischen Stoffwechselaktivität und Akridinorangespeicherung" Naturwiss. 36, 58 (1949)

13. ZEIGER, K. und H. HARDERS: "Über vitale Fluorochromfärbung des Nervengewebes" Z.Zellforschung 36,62 (1951/52)

14. GÖSSNER, W.: Verh.Dtsch.Ges.Path. 33.Tg.Kiel (1949)

15. ZEIGER, K., HARDERS, H. und MÜLLER, W.: "Der STRUGGER-Effekt an der Nervenzelle" Protoplasma 40, 76 (1951)

16. ZEIGER, K. und WIEDE, M: "Die Speicherung von Akridinorange in der Froschleber und ihr Einfluß auf Ausscheidungsvermögen der Leberzelle" Z. Zellforschung 40,401 (1954)

17. SCHÜMMELFELDER, N.: "Die Fluochromierung des lebenden, überlebenden und toten Protoplasmas mit dem basischen Farbstoff Akridinorange und ihre Beziehung zur Stoffwechselaktivität der Zelle" Virchow's Archiv 318, 119 (1950)

18. HÖFLER, K.
TOTH, A. und
LUHÁN, M.: "Beruht die Fluochromfärbung von Zellkernen auf Elektroadsorption an der Eiweißphase?"
Protoplasma 39, 62 (1949/50)

19. HÖFLER, K.: "Fluochromfärbung am lebenden Protoplasma"
Mikrochemie 36/37, 1150 (1951)

20. BOERNER-PATZELT, D.: "Über ursächliche Faktoren der polychromen Fluoreszenz von Geweben und Gewebestrukturen nach Fluorochromierung mit nur einem Fluochrom"
Protoplasma 39, 639 (1949/50)

21. STRUGGER, S.:
Jenaische Z. Med. u. Naturwiss. 73, 97 (1940)

22. ZANKER, V.: "Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate"
Z. physikal. Chemie 199, 255 (1952)

23. KROG, N.: "Die Fluoreszenzmikroskopie in der Lebensmittelindustrie"
Information Carl Zeiß 49, 88 (1963)

24. ENDERLIN, K.: "Vergleichende Untersuchungen zur Technik des Pilznachweises bei Haut- und Nagelmykosen"
Dermatologica 116, 234(1958)

25. PORTO, J.A.: "The use of cellophantape in the diagnosis of tinea versicolor"
I. invest. Derm. 21, 229 (1953)

26. POLEMANN, G.: "Zum Nachweis von Dermatophyten mittels Klebestreifen und Perjodsäure-Schiff-Reagenz-Färbung" Z. Haut- u. Geschl.-Krkh. 23, 76 (1957)

27. GÖTZ, H.: "Über das Auftreten und die Natur der Mosaikfungi" Arch. Derm. Syph. 187, 61 (1948)

28. HIRT, A.: "Die Lumineszenzmikroskopie und ihre Bedeutung für die medizinische Forschung" Zeis-Nachr. 3, 82 (1939)

29. JANKE, D.: "Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Pilzen in der menschlichen Hornschicht" Klin. Wschr. 29, 326 (1951)

30. FLEGEL, H.: "Fluoreszenzmikroskopischer Pilznachweis" Ztsch.f.Haut- u. Geschl.-Krkh. 17, 319 (1954)

31. CHICK, C. und BEHAR, V.: "A simple fluorescent method for detection of superficial fungi in skin and hair" I. Investigat. derm. 37,103 (1961)

Abb. 2

Nachweis von Pilzfäden ohne Wiedergabe struktureller Einzelheiten.

Fluorochrom: Akridinorange 1 : 10 000 und 20 % KOH nach 2^{h} Hellfeldmikroskopie

Abb. 3

Dieselben Pilzfäden wie in Abb. 2, jedoch in fluoreszenzmikroskopischer Darstellung. Die Hyphe erscheint bedeutend kontrastreicher, die Septierung wird gut hervorgehoben.

Fluorochrom: Akridinorange 1 : 10 000 und 20 % KOH 2^{h} nach der Fluorochromierung mit Sperr- und Erregerfilter Fluoreszenzmikroskopie Agfacolor 17^{o} DIN 4^{min} belichtet

Abb. 4

Farbliche Bildwiedergabe einer Nageltrichophytie, fluoreszenzmikroskopisch dargestellt.

Fluorochrom: Akridinorange 1 : 10 000 und
20 % Kalilauge
nach 2^h
Agfacolor 17^o DIN 4^{min} belichtet

Abb. 5

Eine über das Blickfeld ausgedehnte Myceldarstellung. Das Bild zeigt, daß die Fluoreszenzintensität sogar zwischen zwei Septierungen eines Mycels verschieden groß sein kann.

Fluorochrom: Akridinorange 1 : 10 000 und
20 % Kalilauge
nach 2^h
Agfacolor 17^o DIN 4^{min} belichtet

Im Original liegen die Abbildungen 4 - 15 in Farbe vor.

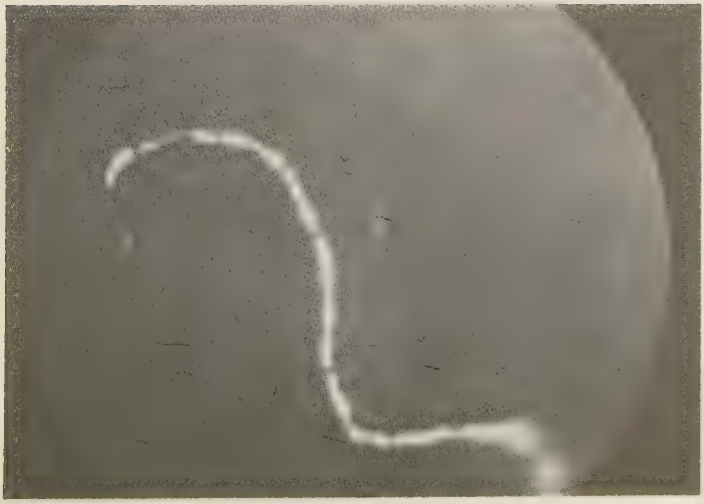


Abb. 6

Myceldarstellung in der üblichen Übersichtsvergrößerung. Nachteilig wirkt sich die reichlich kleine Beleuchtungsfläche in dieser Vergrößerung aus.

Fluorochrom: Berberinsulfat 1 : 10 000 und 20 % Kalilauge

nach 3^{h}

Agfacolor 17^{o} DIN 5^{min} belichtet

Abb. 7

Fluoreszenzbild eines Dermatophyten; zwischen zwei Septierungen sind deutlich eigentümliche Wandaufbauchungen zu erkennen, vermutlich starke Anreicherung des Farbstoffes im Dermatophyten.

Fluorochrom: Coriphosphin 1 : 10 000 und 20 % Kalilauge

nach 2^{h}

Agfacolor 17 DIN 4^{min} belichtet

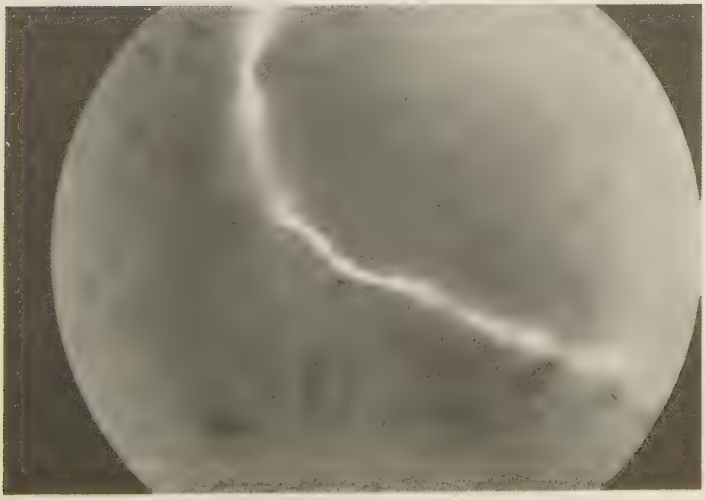


Abb. 8

Wiedergabe eines mit Rhodamin B gefärbten Pilzfilamentes.
Fluorochrom: Rhodamin B 1 : 10 000 und 20 % Kalilauge
nach 3^{h}
Agfacolor 17 DIN 4^{min} belichtet

Abb. 9

Fluoreszenzbild eines Dermatophyten. Das Material wurde nach der Tesafilmabrißmethode gewonnen und fluoreszenzmikroskopisch dargestellt.
Fluorochrom: Akridinorange 1 : 10 000 und 20 % Kalilauge
nach 1^{h}
Agfacolor 17 DIN 3^{min} belichtet

Abb. 10

Fluoreszenzbild einer Stichkultur von Candida Art auf Maismehlagar.

Das Bild zeigt grüne Diffusfluoreszenz von Mycelien und Sporen.

Abb. 11

Die Vergrößerung zeigt morphologische Einzelheiten.

Fluorochrom: Akridinorange 1 : 10 000 und 20 % Kalilauge

Agfacolor 17° DIN 4^{min} belichtet

Abb. 12

Fluoreszenzbild von "Candida albicans" auf Maismehlagar gezüchtet.

Neben Mycelien sieht man Hefezellen in charakteristischer Anordnung.

Abb. 13

Morphologische Einzelheiten in der Vergrößerung.

Fluorochrom: Akridinorange 1 : 10 000 und 20 % Kalilauge

nach 2^{min}

Agfacolor 17^{o} DIN 4^{min} belichtet

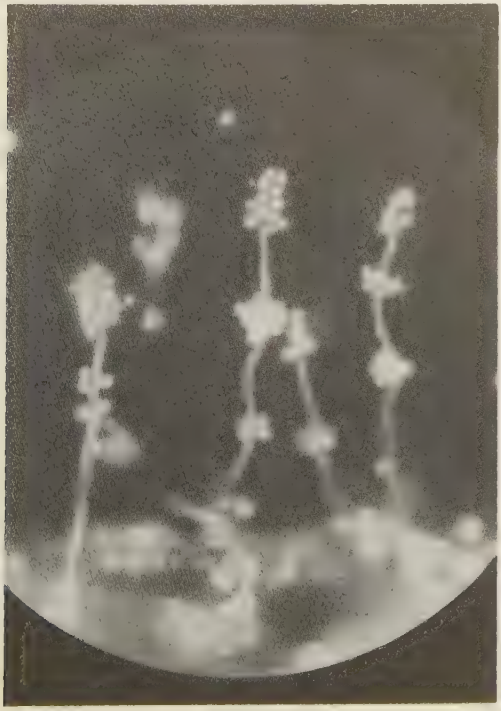


Abb. 14

Vitalfluorochromierung von Sporen.
Candida albicans auf Maismehl gezüchtet.

Gelbliche Fluoreszenz der Sporen, im Zentrum sieht man rotorange Farbstoffgranula.

Fluorochrom: Akridinorange 1 : 1 000

2^{min} nach Anfärbung

Agfacolor 17^{o} DIN 4^{min} belichtet

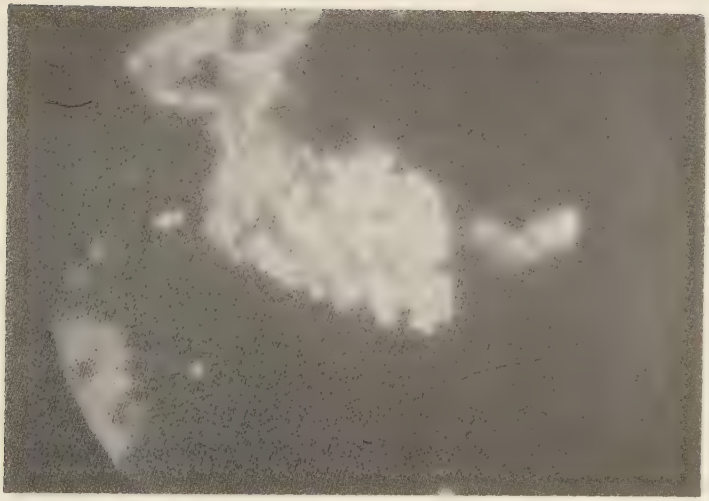
Abb. 15

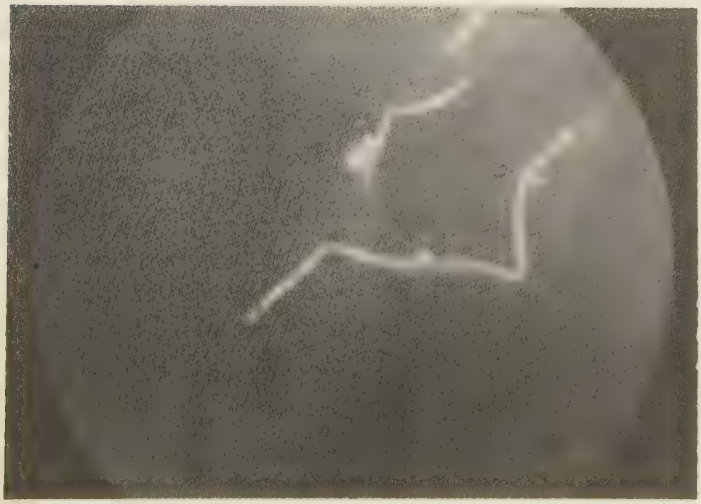
Pseudomycelien von Candida albicans auf Maismehl gezüchtet. Vermutlich stellen die rotorange fluoreszierenden Anteile in den Mycelien Orte hoher Proteinkonzentration dar, demnach bedeutet die dazwischen liegende Grünfluoreszenz Anhäufung von Stärke und Mucopolysaccharide.

Fluorochrom: Akridinorange 1 : 1 000

20^{min} nach Anfärbung

Agfacolor 17^{o} DIN 4^{min} belichtet





An dieser Stelle ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. Kaden für die Themenstellung und die Überwachung der Arbeit herzlich zu danken.

Für wohlwollendes Interesse und wertvolle Anregungen bin ich Herrn Professor Dr. Spier sehr verbunden.

Mein Dank gilt auch der med.-technischen Assistentin Frau Charlotte Kieselbach, die mir bei der Durchführung des experimentellen Teils mit ihrem Rat hilfreich zur Seite stand.

L e b e n s l a u f

Am 4.5.1927 wurde ich, Hans-Ulrich Rusch, als Sohn des Zahnarztes Willy Rusch und dessen Ehefrau Gertrud geb. Zodtke, in Plathe in Pommern geboren. Nach Besuch der Grundschule in Plathe und der Oberschule in Treptow a/Rega wurde ich 1944 mit dem Notabitur zum Kriegsdienst verpflichtet. 1950 kehrte ich aus russischer Kriegsgefangenschaft nach Berlin zurück. Nach zweijährigem Besuch der Peter-A.-Silbermann-Schule legte ich 1957 die Reifeprüfung ab.

Mit dem Sommersemester 1957 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Freien Universität Berlin, wo ich am 13.11.1959 die zahnärztliche Vorprüfung und am 13.10.1962 die zahnärztliche Prüfung bestand. Seit dem 15.10.62 bin ich als Pflichtassistent bei einem Zahnarzt in Berlin-Charlottenburg beschäftigt.

Photodruck der Photo Copie GmbH.